

Universidad de Cádiz
Facultad de ciencias del mar y ambientales



**EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO Y
PERSPECTIVA HISTOLÓGICA/HISTOQUÍMICA
EN DORADAS (*SPARUS AURATA*) ALIMENTADAS
CON PIENSOS VEGETALES Y SUPLEMENTADAS
CON COMPUESTOS NUTRACÉUTICOS**

TRABAJO DE FIN DE GRADO

GRADO EN CIENCIAS DEL MAR

Autor: Jaime Pons Mayans

Tutores: Juan Antonio Martos Sitcha

Milagrosa Oliva Ramírez

Fecha: 03/07/2020

El **Dr. Juan Antonio Martos Sitcha** y la **Dra. Milagrosa Oliva Ramírez**, Profesores del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales, como tutores del Trabajo Fin de Grado titulado: “Evaluación del crecimiento y perspectiva histológica/histoquímica en doradas (*Sparus aurata*) alimentadas con piensos vegetales y suplementadas con compuestos nutraceuticos”, realizado por D. Jaime Pons Mayans,

INFORMAN

Que dicho Trabajo Fin de Grado se ha realizado bajo nuestra dirección en las dependencias del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales de la Universidad de Cádiz.

Y para que así conste, firmamos el presente informe en Puerto Real, a 2 de julio de 2020.



Fdo.: Dr. Juan Antonio Martos Sitcha



Fdo.: Dra. Milagrosa Oliva Ramírez

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|-----------|
| Resumen y Abstract..... | 1 |
| 1. Introducción..... | 2 |
| 1.1 Biología y distribución geográfica de la dorada <i>Sparus aurata</i> | 2 |
| 1.2 Características fisiológicas e histomorfológicas del hígado y del intestino anterior en peces teleósteos..... | 3 |
| 1.2.1. Hígado..... | 3 |
| 1.2.2. Intestino anterior..... | 5 |
| 1.3 La alimentación en la acuicultura..... | 7 |
| 1.3.1. Tipos de piensos utilizados en acuicultura..... | 7 |
| 1.3.2. Alternativa al aceite de pescado y compuestos funcionales..... | 7 |
| 1.4. Objetivo del proyecto..... | 9 |
| 2. Material y Métodos..... | 10 |
| 2.1.Diseño experimental..... | 10 |
| 2.2.Cálculos zootécnicos y condición corporal..... | 12 |
| 2.3.Métodos histológicos..... | 14 |
| 2.4.Análisis estadístico..... | 16 |
| 2.5.Limitaciones durante el desarrollo del trabajo..... | 17 |
| 3. Resultados y discusión..... | 18 |
| 4. Conclusiones..... | 27 |
| 5. Bibliografía..... | 28 |
| 6. Anexos..... | i |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1.1. Imagen de un ejemplar de dorada (<i>S. aurata</i> , Linnaeus 1758)..... | 2 |
| Figura 1.2. Disección y visualización dorso-ventral del hígado de <i>Sparus aurata</i> | 3 |
| Figura 1.3. Corte histológico de hígado de salmón (<i>Salmo salar</i>) (H&E 20x)..... | 4 |
| Figura 1.4. Disección de la cavidad visceral, posición dorso-lateral de <i>S. aurata</i> | 5 |
| Figura 1.5. Corte histológico de intestino de trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) (H&E x25).... | 6 |
| Figura 2.1. Diseño experimental para los productos LB-ImmunoBoost y LB-LiverProtect..... | 11 |
| Figura 2.2. Etiquetado de las doradas extraídas de cada tratamiento para su posterior disección.... | 12 |
| Figura 2.3. Disección para la medición del intestino completo, desde el final de los ciegos pilóricos (izquierda) hasta el recto (derecha)..... | 13 |
| Figura 2.4. Esquema del proceso del tratamiento de muestras previo al parafinado..... | 14 |
| Figura 2.5. Imagen de estación de parafinado..... | 15 |
| Figura 2.6. Fotografía micrótopo Leica RM2125RT..... | 15 |
| Figura 3.1. Evolución del crecimiento (A), peso final (B), tasa de crecimiento específica (C) y eficiencia de alimentación (D) en juveniles de dorada (<i>S. aurata</i>) alimentados durante 12 semanas con cuatro dietas experimentales..... | 19 |
| Figura 3.2. Índice de longitud del intestino (ILI) en juveniles de dorada (<i>S. aurata</i>) alimentados durante 12 semanas con cinco dietas experimentales..... | 20 |
| Figura 3.3. A. Cortes histológicos de intestino anterior de dorada que hipotéticamente podrían corresponderse con los de ejemplares alimentados con piensos animales (C+) (tinción PAS, Barra: 50 µm). B. Estado hipotético del intestino anterior con alteraciones en doradas pertenecientes al grupo C- (H&E, Barra: 20 µm)..... | 21 |
| Figura 3.4. A. Cortes histológicos de intestino anterior de dorada que hipotéticamente podrían corresponderse con los de ejemplares del grupo C+. B. Supuesto estado del intestino anterior en doradas del grupo LP..... | 21 |
| Figura 3.5. Capa mucosa en intestino anterior de dorada con degeneración (aumento del espacio intercelular), de forma hipotética, en el grupo experimental LP..... | 22 |
| Figura 3.6. Epitelio de la mucosa en intestino anterior de dorada con grados leve de degeneración (baja vacuolización y leve infiltración de enterocitos en la submucosa) que, de forma hipotética, se podrían encontrar en el grupo experimental IB..... | 22 |
| Figura 3.7. Índice hepatosomático (IHS, A) e índice mesentérico (MSI, B) en juveniles de dorada (<i>S. aurata</i>) alimentados durante 12 semanas con cuatro dietas experimentales. | 23 |
| Figura 3.8. A y B. Microfotografías de hígado de lubina (<i>Dicentrarchus labrax</i>) (Tinciones Negro Sudan, Barras: 50 µm). C y D. Microfotografías de trucha arcoíris (<i>Onchorhynchus mykiss</i>) (Tinciones diatasas-PAS, Barras: 50 µm)..... | 24 |

Resumen

El objetivo del presente Trabajo de Fin de Grado es analizar el rendimiento productivo y plantear una perspectiva histológica, de juveniles de dorada (*Sparus aurata*) alimentados con piensos vegetales y suplementados con compuestos nutraceuticos de constitución microalgal. Para ello, se testaron por separado los compuestos nutraceuticos LB-LiverProtect y LB-ImmunoBoost sobre un pienso vegetal. Se calcularon diferentes índices de rendimiento productivo y zootécnicos, asimismo se realizó un estudio histológico del hígado e intestino anterior. Los resultados referentes a la suplementación con LB-LiverProtect no mostraron diferencias notables; sin embargo, se interpretaron valores superiores del nivel productivo e índices zootécnicos en las doradas suplementadas con LB-ImmunoBoost, acompañados de una hipotética mejora de la estructura e integridad a nivel histológico del intestino, debido a una presunta mejora la integridad intestinal estimulando la respuesta inmune de manera local. El supuesto análisis histológico del hígado no mostró diferencias entre los grupos experimentales.

Palabras clave: Rendimiento productivo, histología, nutraceutico, suplementos, zootecnia, integridad, funcionalidad, respuesta inmunitaria local.

Abstract

The aim of this project was to analyse the growth performance and raise a histological perspective of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles fed with vegetal feeds and supplemented with nutraceutical compounds of microalgal constitution. For this purpose, the nutraceutical compounds LB-LiverProtect and LB-ImmunoBoost were tested separately on a vegetable-based diet. Different production and zootechnical performance indexes were calculated; moreover, a histological study of the liver and foregut was performed. Results concerning the supplementation with LB-LiverProtect did not show remarkable differences, although higher values of the production level and zootechnical indices were interpreted in the gilthead sea bream supplemented with LB-ImmunoBoost accompanied by a hypothetical improvement of the structure and integrity at the histological level of the intestine, leaded by an improvement of the intestinal integrity by stimulating the immune response locally. The supposed histological analysis didn't display hypothetical differences within experimental groups.

Key words: Growth performance, histology, nutraceuticals, supplements, zootechnics, integrity, functionality, local immune response.

1. Introducción

1.1 Biología y distribución geográfica de la dorada, *Sparus aurata*

La dorada (*Sparus aurata*, Linnaeus 1758) es un teleósteo marino (Clase Actinopterygios; Orden Perciformes; Familia Sparidae) que presenta un cuerpo ovalado y comprimido lateralmente. Respecto a sus dimensiones físicas, en estado salvaje, los ejemplares presentan una longitud media de 30-35 cm (encontrándose ejemplares de 70 cm) y pueden llegar a pesar hasta 17 kg (Bauchot y Hureau, 1986).

Su coloración es gris plateada y se caracteriza por presentar una mancha negra, que se encuentra en el origen de la línea lateral y se extiende sobre el margen superior del opérculo. También presenta una singular banda dorada que se sitúa entre los ojos (esta no se encuentra bien definida en individuos juveniles) que es el origen de su nombre específico en latín (*Sparus auratus*: pez con mancha en la frente de color oro) (Bauchot y Hureau, 1986; Arias y de la Torre, 2019) (**Figura 1.1.**).



Figura 1.1. Imagen de un ejemplar de dorada (*S. aurata*, Linnaeus 1758). Fuente: Arias y de la Torre, 2019.

La dorada es una especie costera cuya dieta está basada principalmente en moluscos y crustáceos. Se distribuye comúnmente en el mar Mediterráneo, estando también presente en las costas del Atlántico, pudiéndose encontrar así mismo desde el este de Gran Bretaña hasta Senegal y rara vez en el Mar Negro (Pavlidis y Mylonas, 2011).

Debido a su naturaleza eurihalina y euriterma, esta especie puede habitar tanto ambientes marinos salobres, como lagunas costeras o áreas estuarinas, donde la salinidad es más baja. Por otro lado, es muy sensible a temperaturas bajas, fijándose su límite letal entorno a los 4 °C (Pavlidis y Mylonas, 2011).

Nacidos en mar abierto durante los meses de octubre-diciembre, los juveniles migran a principios de primavera hacia aguas costeras (~30 m) protegidas donde pueden encontrar abundantes recursos tróficos y temperaturas más suaves. A finales de otoño, los

individuos vuelven a mar abierto (hasta 150 m de profundidad) donde los adultos se reproducen (Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO, 2020).

1.2. Características fisiológicas e histomorfológicas del hígado e intestino anterior de peces teleósteos

1.2.1. Hígado

El hígado (**Figura 1.2.**), es una glándula desarrollada a partir de una evaginación de la cavidad digestiva primitiva con origen endodérmico. Es un órgano situado ventralmente en la región craneal de la cavidad visceral que además cuenta con un aspecto graso y un color amarillo-crema (Hibiya, 1982).



Figura 1.2. Dissección y visualización dorso-ventral del hígado de *Sparus aurata*. Fuente: modificación propia a partir de Abdel-Latif et al., 2015.

Entre las diversas acciones que desempeña, el hígado presenta una doble funcionalidad, tanto endocrina como exocrina. Cumple una función endocrina al ser lugar de síntesis de diferentes hormonas (*e.g.* Factor de crecimiento insulínico tipo 1, IGF-1) (Pavlidis y Mylonas, 2011) y también adquiere la característica de glándula exocrina con la producción de bilis. La bilis efectúa una función clave en el metabolismo de los lípidos, ya que es la encargada de emulsionar la grasa de los alimentos y así hacer más sencillo su metabolismo (Suematsu, 2001). Tras este proceso, el hígado sirve como tejido de almacenamiento o transformación de algunos de los diversos metabolitos derivados, como en el caso de la glucosa, que es almacenada en forma de glucógeno en los hepatocitos (Hibiya, 1982; Carneiro y Junqueira, 2008).

Respecto al metabolismo de los lípidos, las cadenas complejas de lípidos son metabolizadas en cadenas más simples de ácidos grasos, que posteriormente son absorbidos por el intestino, transportados por el plasma y asimilados, tanto por el hígado, como por otros tejidos de almacenamiento (Sheridan, 1988).

Además, el hígado desempeña una función vital en los procesos de almacenamiento de la glucosa, siendo la principal la formación de glucógeno

(glucogenogénesis). Por otro lado, existe otra ruta metabólica de almacenamiento de energía metabolizando glucosa, como es el caso de la lipogénesis, que transforma la glucosa en lípidos. De manera inversa, existe la ruta de la gluconeogénesis, por la que se obtiene glucosa a partir de componentes lipídicos, mayoritariamente también realizada por el hígado (Fawcett, 1995; Polakof et al., 2012).

Desde un punto de vista histológico, el hígado es un órgano parenquimatoso donde los hepatocitos (**Figura 1.3.**) son la unidad funcional básica del hígado, conformándose como las células mayoritarias (80 %). Los hepatocitos son células poliédricas con un tamaño de entre 20 a 30 μm de diámetro, poseen uno o varios núcleos centrados y su forma es redondeada. Estos se disponen en láminas de una célula de espesor, que a su vez se unen unas con otras formando estructuras tridimensionales llamados lóbulos hepáticos. Entre los espacios de dichas láminas se encuentran capilares llamados sinusoides, compuestos por una capa discontinua de endotelio fenestrado (Fawcett, 1995; Carneiro y Junqueira, 2008).

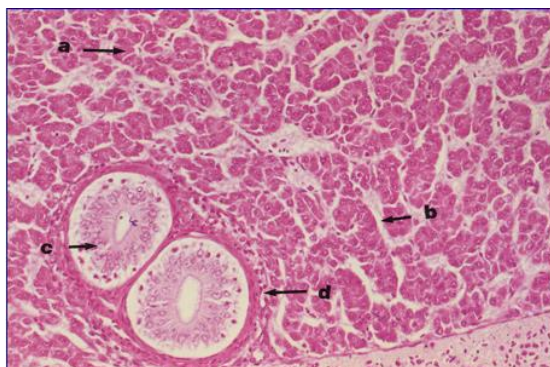


Figura 1.3. Corte histológico de hígado de salmón (*Salmo salar*) (H&E 20x). **Hepatocitos (a), sinusoides (b), conducto biliar (c) y músculo liso (d).** Fuente: Bruno y col, 1996.

Inmerso en esta trama celular hallamos un sistema vascular desarrollado. La sangre que procede del tubo digestivo llega al hígado a través de la vena portal, mientras que la sangre arterial del individuo llega al hígado por la arteria hepática. Todos los vasos sanguíneos mayores se ramifican en vasos menores hasta alcanzar los sinusoides, donde se lleva a cabo el intercambio de sustancias con los hepatocitos. Por último, la sangre se distribuye hacia el resto del cuerpo por medio de la vena hepática (Hibiya, 1982).

Por todo lo anteriormente descrito, el hígado es un órgano de especial interés para realizar estudios histológicos relacionados a cambios o alteraciones provocadas por cambios en el hábito alimenticio.

1.2.2. Intestino anterior

El intestino (**Figura 1.4.**), es un órgano tubular perteneciente al aparato digestivo situado en la zona media de la cavidad visceral, entre el estómago y el ano. En teleósteos está dividido en intestino anterior e intestino posterior, existiendo también una porción intermedia (intestino medio) de características difusas entre funcionalidad anterior y posterior. Por su parte, la porción final más cercana al ano, y separada por un esfínter, se le llama recto. La forma y dimensiones del tubo digestivo dependen del tipo de alimentación del individuo. Así, las especies carnívoras presentan un tubo digestivo más corto respecto a las especies herbívoras, ya que estas últimas necesitan una mayor longitud del intestino para aumentar la superficie de absorción debido a la naturaleza altamente celulósica de su alimentación (Carneiro y Junqueira, 2008; Salinas, 2011).

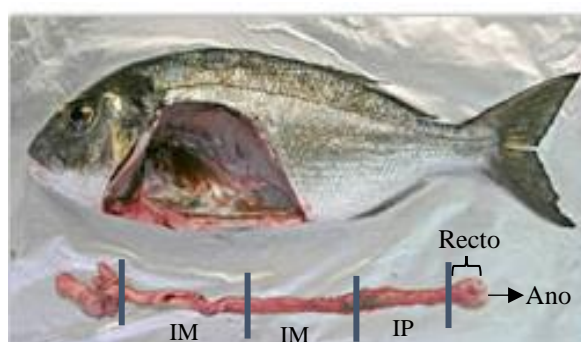


Figura 1.4. Diseccción de la cavidad visceral, posición dorso-lateral de *S. aurata*. Extracción de tubo digestivo donde se observa el intestino anterior (IA), el intestino medio (IM), el intestino posterior (IP), el recto y el ano. Fuente: modificación propia extraído de: FAO, 2005.

Además de efectuar una importante función de defensa frente al medio externo y un cometido clave en los procesos de osmorregulación en teleósteos, el intestino desempeña una función esencial en la digestión del alimento a través de la absorción de nutrientes (Salinas, 2011). La digestión del alimento es promovida por la acción de diversas enzimas digestivas (amilasa, peptidasa, lipasa, maltasa, etc) (Geneser, 1986; Science Learning Hub, 2011).

Histológicamente, el intestino de la dorada es muy parecido al de la mayoría de los vertebrados, y su estructura histológica se divide en 4 capas principales (**Figura 1.7.**): mucosa, submucosa, muscular (muscular interna y externa) y serosa (Salinas, 2011; Cerezuela y col., 2012).

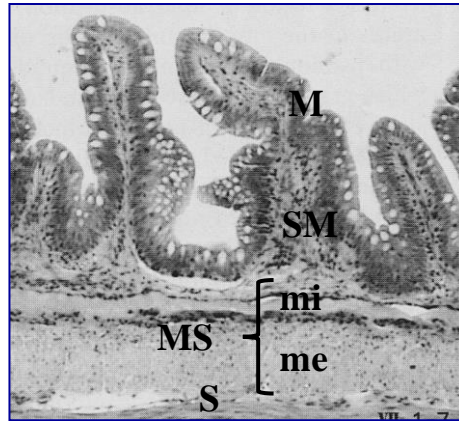


Figura 1.5. Corte histológico de intestino de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (H&E x25). **Capa mucosa (M), submucosa (SM), perteneciente a la muscular (MS): muscular interna (mi), muscular externa (me) y finalmente serosa (S).** Fuente: modificación propia a partir de Hibiya, 1982.

La capa mucosa está compuesta por una capa de células epiteliales con forma columnar (enterocitos) entre las que observamos células caliciformes o mucosas. Los enterocitos son células especializadas, encargadas de la absorción de nutrientes derivados de la digestión para su transferencia al torrente sanguíneo. Presentan en la zona apical una serie de elongaciones citoplasmáticas (microvellosidades) cuyo fin es el aumento de superficie de contacto con el lumen gastrointestinal. Por otro lado, las células caliciformes protegen y lubrican el epitelio de revestimiento del intestino, lo que facilita el tránsito del quimo a través del lumen intestinal (Hibiya, 1982; Geneser, 1986; Barker y col., 2014).

La capa submucosa está formada por tejido conjuntivo areolar grueso compuesto de fibras colágenas y elásticas, glándulas, vasos sanguíneos y linfáticos de mayor calibre. La capa muscular está formada por una doble capa: una interna circular y otra externa longitudinal formadas ambas por músculo liso. Finalmente la capa serosa, compuesta por una capa de epitelio simple, resulta ser una extensión del mesenterio y cubre toda la superficie del tubo digestivo (Hibiya, 1982; Salinas, 2011).

Cabe reseñar que un correcto mantenimiento de la integridad y estructura del intestino se basa en una constante interacción de 3 componentes: la microbiota, la capa mucosa y el sistema inmunitario local. Un equilibrio dinámico y balanceado entre estos elementos es esencial para un buen desarrollo de la homeostásis intestinal, que se traduce en una adecuada defensa, nutrición y crecimiento del individuo (McGuckin, 2009).

Por todo lo anteriormente expuesto, el estudio histomorfológico e histoquímico del intestino resulta de gran interés para un análisis de la salud intestinal frente a un cambio de dieta.

1.3. La alimentación en la acuicultura

1.3.1. Tipos de piensos utilizados en acuicultura

En la actualidad, existe un amplio abanico de posibilidades en relación a los ingredientes utilizados en el pienso para acuicultura, los cuales vienen definidos dependiendo de la especie y el ciclo de vida en el que están los organismos. Generalmente el pienso utilizado en acuicultura está constituido por pellets deshidratados, y formulado a partir de distintos aceites y harinas vegetales y/o de origen animal que aportan la mayor parte de proteínas, carbohidratos y grasas, además de otros compuestos esenciales como vitaminas y minerales. La composición y aptitud nutricional final del pienso dependerá principalmente de los requerimientos nutricionales de la especie a cultivar (herbívora, omnívora o carnívora) (CECOPESCA, 2012; FAO, 2018).

En lo referente al pienso utilizado para *S. aurata*, como especie carnívora, se centra en una mezcla de vitaminas, minerales, harinas y aceites de pescado, además de la introducción cada vez más importante de harinas y aceites de origen vegetal (principalmente soja y maíz). Aun así, la introducción de fuentes de proteína y lípidos de origen animal en la formulación sigue siendo esencial y fundamental en la dieta de la dorada para garantizar una baja mortalidad y alta calidad del cultivo, debido a su alta calidad nutricional y digestibilidad (NOAA, 2018).

Cabe reseñar que el ratio de conversión del alimento en peces es mayor que en animales terrestres, es decir, para obtener 1 kilogramo de pescado se necesita una menor cantidad de pienso que para producir 1 kilogramo de animales terrestres, lo que refleja el gran interés que supone la acuicultura en la actualidad y en vistas a la mayor demanda de proteína animal como consecuencia del aumento de la población (FAO, 2018).

1.3.2. Alternativas al aceite y harina de pescado: alimentos funcionales

Debido a su alta calidad nutricional, las harinas y aceites de pescado suponen un gran interés como ingredientes de piensos utilizados en la acuicultura. Su producción alcanzó su máximo en 1994, año en el cual alrededor de 30 millones de toneladas de pescado fueron destinados a la elaboración de harina y aceite de pescado, suponiendo cerca del 36% de la pesquera mundial empleada en la manufactura de subproductos pesqueros. Desde entonces, el sector acuícola se percató de que la utilización de un recurso limitado, como es el aceite o las harinas de pescado, resultaría insuficiente e insostenible para el futuro abastecimiento de la producción en la acuicultura

(CECOPESCA, 2012; FAO, 2018). Por ello, este déficit de abastecimiento se ha traducido en un gran auge, a nivel científico, acerca de la búsqueda de una alternativa funcional a estos ingredientes tan importantes en la formulación de piensos.

Hoy en día, se buscan otros ingredientes nutricionalmente válidos que disminuyan el impacto ambiental y certifiquen la seguridad alimentaria para sustituir, en la mayor proporción posible, al aceite y harinas de pescado. Opciones como las que dan bivalvos y macroalgas (Sørensen y col., 2016; Saiz, 2019), son actualmente estudiados en diferentes especies de peces, incluida la dorada. Entre ellos, destacan las materias primas de origen vegetal tales como harina de colza y harina de soja, con estudios de campo muy prometedores que han derivado en su inclusión con éxito como ingredientes en la alimentación de peces carnívoros (Cabral y col., 2011; Nagel y col., 2012).

A pesar de todo, los ingredientes de origen vegetal presentan un amplio rango de efectos nutricionales adversos, en donde altos porcentajes de sustitución con dichos elementos conllevan valores menores de crecimiento que en los grupos control (uso de aceite y harina de pescado) según han demostrado diversos autores (Lin y Luo, 2011; Kokou, 2012). En el estudio de dichos efectos a nivel tisular e histológico, se ha demostrado que altas inclusiones de harinas vegetales provocan daños tisulares en el intestino de doradas (Santigosa, 2008; Kokou, 2012), incluyendo una disminución de la integridad epitelial del intestino anterior (Estensoro y col., 2016).

Con el fin de minimizar los efectos antinutricionales inducidos por los ingredientes de origen vegetal, la propuesta del uso de microalgas como suplemento en piensos resulta de gran interés a nivel productivo. Debido a su gran variabilidad nutricional, las microalgas presentan gran cantidad de compuestos funcionales, y nutrientes como aminoácidos y ácidos grasos esenciales, por lo que compuestos derivados de microalgas presentan un gran potencial como alimentos funcionales en la formulación y producción de piensos acuícolas (Lupatsch, 2009).

El papel que ocupa las microalgas como sustituto de harina y aceite de pescado en teleósteos es algo difuso, ya que las investigaciones de sus efectos sobre el crecimiento de teleósteos no convergen en un resultado claro, observándose en algunos una mejora en el rendimiento del individuo, en otros una disminución del mismo, y en algunos otros no se han observado efectos (Güroy, 2007; Vizcaíno y col., 2014; Sorensen y col., 2016).

De acuerdo con Harel y col (2002), la producción de microalgas a gran escala se puede conseguir con el control adecuado de las condiciones ambientales a las que están

sometidas, aunque los costes actuales de producción durante su uso en piensos de acuicultura todavía están lejos de resultar económicamente rentables (Andreotti, 2019).

Para entender mejor el objetivo del estudio debemos conocer la definición de compuestos funcionales. Los compuestos funcionales son aquellos que, a pesar de sus características nutricionales, poseen aptitudes que ejercen beneficios en las funciones del organismo. El objeto final de los compuestos funcionales es de producir un efecto nutracéutico sobre el individuo. Los nutracéuticos son suplementos dietéticos concentrados y extraídos de sustancias naturales bioactivas que ejercen un beneficio sobre la salud fisiológica, local y general, del organismo a cultivar (Ferreira-Montero y Luengo-Fernández, 2007). Así, se ha demostrado que el uso de nutracéuticos contrarresta los efectos antinutricionales que provocan los piensos vegetales en *S. aurata* (Pérez-Sánchez y col., 2015; Estensoro y col., 2016).

Con todas estas premisas, el presente Trabajo Fin de Grado evaluará el potencial beneficio de los diferentes compuestos funcionales procedentes de las microalgas y producidos por la *Spin-Off* Life Biocapsulation S.L. (Almería), analizando así sus características nutracéuticas, con el fin de suplir las carencias que produce una alta sustitución de harinas y aceites de pescado por otros de origen vegetal. De esta forma, los dos compuestos utilizados fueron los nutracéuticos LB-ImmunoBoost y LB-LiverProtect, formado por derivados fermentados e hidrolizados de levaduras enriquecidos con microalgas ricas en proteínas, vitaminas B y E, minerales, β -carotenos (antioxidante) y ácidos grasos esenciales (ácido γ -linoleico). Atendiendo a sus propiedades, dicho compuesto estaría encaminado a producir efectos beneficiosos en i) estabilización del tracto gastrointestinal y efecto prebiótico; ii) protección contra el daño celular y tisular causado por los radicales libres; iii) Mejora de los mecanismos de defensa celular y humoral; iv) maduración y fortalecimiento del sistema inmunológico en edades tempranas; v) mayor resistencia a infecciones y condiciones estresantes; vi) mejorar el crecimiento e índices de conversión e integridad intestinal; mejorar el rendimiento hepático y renal.

1.4. Objetivo del proyecto

El objetivo del presente trabajo es analizar el rendimiento productivo y plantear una perspectiva histomorfológica e histoquímica, centrado en hígado e intestino anterior, de doradas (*Sparus aurata*) alimentadas con cuatro dietas diferentes, varias de ellas suplementadas con compuestos nutraceúticos.

2. Material y Métodos

2.1. Diseño experimental

En el presente trabajo se testaron cuatro piensos diferentes en dorada (*Sparus aurata*): i) un pienso estándar, que no incluye ningún tipo de aditivo funcional, con composición nutricional basada en harina y aceite de pescado (~20 % de materias primas de origen marino) próxima a las que existen actualmente en el mercado para la dorada, denominado “C+”; ii) un pienso con un alto porcentaje de sustitución de aceite y harina de pescado por proteína y aceites de origen vegetal (~ 5-10 % de materias primas de origen marino), denominado “C-”; iii) otro pienso compuesto por la dieta extrema vegetal (C-) con una suplementación al 1 % (10 g por kg de pienso) del producto LB-ImmunoBoost, denominado “IB”; y iv) un cuarto pienso compuesto por la dieta extrema vegetal (C-) con una suplementación al 1 % (10 g por kg de pienso) del producto LB-LiverProtect, denominado “LP”.

Durante la experimentación se utilizó un sistema de 12 tanques de 400 L de capacidad cada uno (densidad de carga inicial 1,5-2 kg/m³) con un número total de peces de n = 30 por tanque. El número de peces propuesto para experimentación ha sido calculado acorde a una densidad óptima de cultivo para la dorada, con el fin de evitar cualquier problema de estrés, conductual o de alimentación. En el experimento se emplearon juveniles de dorada de un peso aproximado de 27-28 gramos, distribuidos aleatoriamente en los tanques experimentales mediante la realización de un muestreo biométrico previo en las instalaciones del Centro Tecnológico de la Acuicultura de Andalucía (CTAQUA, El Puerto de Santa María).

Cada una de las dietas fue ensayada en tanques (por triplicado) bajo condiciones naturales de fotoperiodo y a temperatura (21-22 °C) y salinidad (36 ‰) constantes. Los ensayos se iniciaron tras un periodo de aclimatación de los animales a los tanques de experimentación de dos semanas, tiempo en el que los animales fueron alimentados con el pienso comercial de composición similar a la del pienso control (C+).

La alimentación se realizó hasta saciedad aparente (*ad libitum*) 2 veces al día durante 5-6 días por semana. Diariamente se ajustaron los caudales de entrada de agua, y se registraron los niveles de oxígeno disuelto (>85 % de saturación) y nitritos para garantizar unas condiciones óptimas de cultivo. La experiencia finalizó tras 90 días de alimentación con cada uno de los piensos experimentales (**Figura 2.1.**).

Con el fin de estudiar la capacidad de respuesta de los animales frente a las diferentes formulaciones y nutraceuticos empleados, se determinó el rendimiento productivo a través del crecimiento y la eficiencia de conversión del alimento durante todo el periodo experimental. Para ello, se realizó muestreos biométricos cada 3-4 semanas mediante procedimiento de anestesia ligera (0,5 mL de 2-fenoxietanol/L agua de mar), y se registró la cantidad de alimento ingerido por cada una de las unidades experimentales de forma semanal por medio de métodos gravimétricos (g de pienso consumido/tanque). A partir de los datos obtenidos en el ensayo de alimentación, se calcularon diferentes índices zootécnicos, como la tasa de crecimiento específico (SGR) y eficiencia de conversión (ver apartado 2.2.).

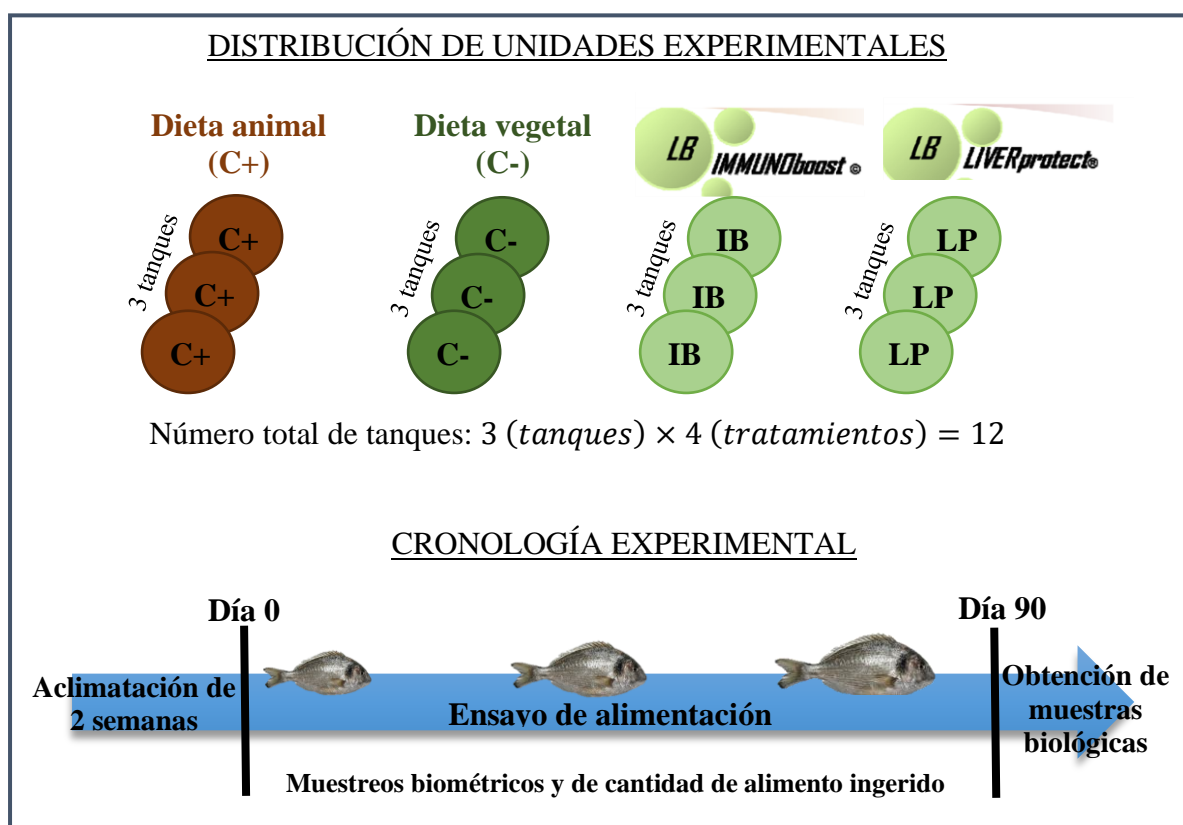


Figura 2.1. Diseño experimental para los productos LB-ImmunoBoost y LB-LiverProtect. Fuente: propia.

Una vez transcurrido 90 días desde el comienzo del ensayo, se extrajeron 6 doradas de manera aleatoria de cada uno de los tratamientos para su procesamiento histológico, obteniendo finalmente un total de 24 individuos (**Figura 2.2.**). Los individuos fueron sacrificados con una dosis letal de 2-fenoxietanol (1 mL/L agua de mar), para la futura obtención de muestras biológicas que permitieran evaluar el efecto de la suplementación de la dieta con productos nutraceuticos, sobre diversos aspectos relacionados con la integridad, funcionalidad y estructura del hígado e intestino anterior.

Tras la necropsia de los individuos, a través de un corte desde la base del ano hasta la zona opercular inferior, y otro desde la base del ano hasta la zona opercular superior (dejando así la cavidad visceral descubierta), se extrajo el intestino, el hígado y la grasa perivisceral para proceder a su medida (cm) o pesaje (g peso fresco), y se procedió al cálculo del índice de longitud del intestino (ILI), el índice hepatosomático (IHS), y el índice mesentérico (MSI), respectivamente. Posteriormente se tomaron biopsias representativas de hígado e intestino anterior.

Finalmente, las muestras se fijaron en formol tamponado a pH 7,2 durante al menos 48 h para asegurar la conservación del tejido, y fueron almacenadas hasta su procesado.

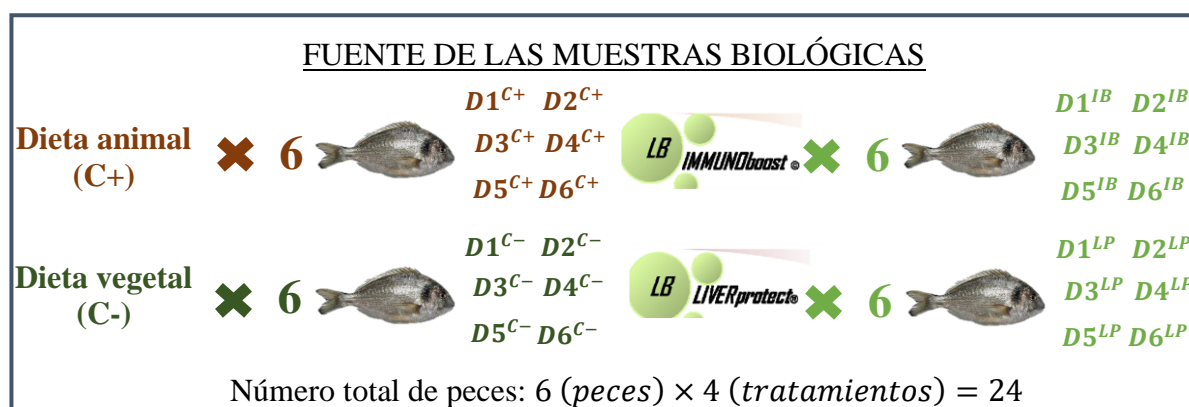


Figura 2.2. Etiquetado de las doradas extraídas de cada tratamiento para su posterior disección. Fuente: propia.

Todos los procedimientos experimentales fueron llevados a cabo siguiendo las directrices dadas por el Consejo de la Unión Europea (2010/63/UE), legislación española (ley 32/2007 y RD 53/2013) y la Universidad de Cádiz para el uso de animales de laboratorio. Además, el presente modelo experimental cuenta con la aprobación de la Junta de Andalucía para el uso y manipulación de animales de experimentación, con el número de autorización 23/10/2019/176.

2.2. Cálculos zootécnicos y de condición corporal

Para evaluar la evolución del crecimiento de los animales, junto a las muestras de peso final de los ejemplares se calculó la eficiencia de conversión del alimento a partir de las fórmulas:

- **Tasa específica de Crecimiento (SGR):** se define como la variación del peso corporal a lo largo del tiempo (%/día).

$$SGR = \left[\frac{\ln \text{ peso húmedo final (g)} - \ln \text{ peso húmedo inicial (g)}}{\text{tiempo (días)}} \right] * 100$$

- **Eficiencia de conversión:** es la relación existente entre el aumento del peso de los animales respecto al alimento ingerido de forma voluntaria hasta saciedad aparente (*ad libitum*) (%).

$$\text{Eficiencia de conversión} = \left[\frac{\Delta \text{ biomasa (g)}}{\text{consumo alimento seco (g)}} \right]$$

Para evaluar las condiciones corporales y funcionales del intestino e hígado se han empleado las siguientes formulas:

- **Índice de la longitud del intestino (ILI):** es la relación existente entre la longitud del intestino, desde ciegos pilóricos hasta el ano (**Figura 2.3.**), respecto a la longitud furcal del pez (distancia desde la boca hasta la base de la aleta caudal) (%).

$$ILI = \left[\frac{\text{longitud del intestino (cm)}}{\text{longitud furcal (cm)}} \right] * 100$$

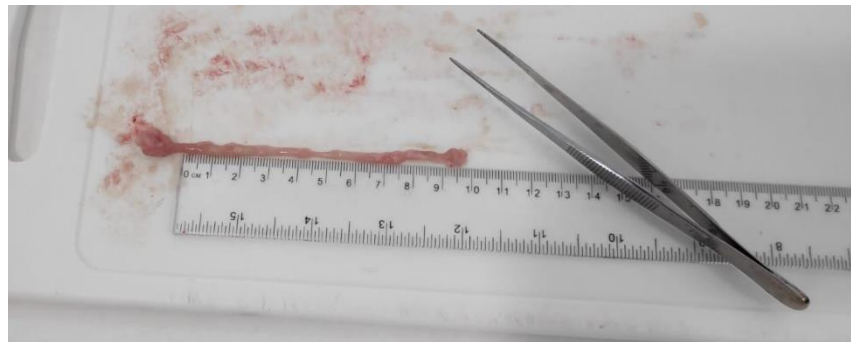


Figura 2.3. Disección para la medición del intestino completo, desde el final de los ciegos pilóricos (izquierda) hasta el recto (derecha). Fuente: Juan Antonio Martos-Sitcha (Tutor).

- **Índice hepatosomático (IHS):** es la relación existente entre el peso del hígado respecto al peso total del pez (%).

$$IHS = \left[\frac{\text{peso del hígado (g)}}{\text{peso total del animal (g)}} \right] * 100$$

- **Índice mesentérico (MSI):** es la relación existente entre el peso de la grasa perivisceral respecto al peso total del pez (%).

$$MSI = \left[\frac{\text{peso de la grasa epivisceral (g)}}{\text{peso total del animal (g)}} \right] * 100$$

2.3. Métodos histológicos

2.3.1. Inclusión de parafina

Las muestras se lavaron durante dos horas en agua corriente para proceder a la eliminación del fijador en los tejidos. El agua no es miscible con la parafina (nuestro medio de inclusión), y por lo tanto se realizó una cuidadosa deshidratación de las muestras en soluciones de etanol de graduación creciente (70 %, 90 % y 100 %) de 2 horas en cada solución. El etanol tampoco es miscible con la parafina, por lo que se realizó un aclaramiento en xilol (disolvente orgánico miscible con la parafina) de 30 minutos (**Figura 2.4.**).

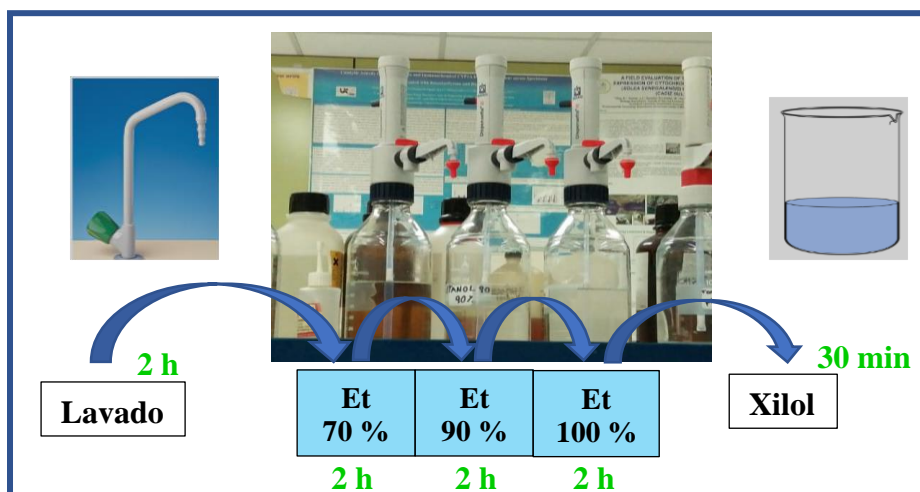


Figura 2.4. Esquema del proceso del tratamiento de muestras previo al parafinado. Fuente: propia, interpresa.net y publicdomainvectors.org

Durante el proceso se producen varios vapores producto de la manipulación de los elementos anteriormente nombrados, alguno es cancerígeno, como en el caso del xilol, por lo que es importante el uso de una campana extractora durante todo el procedimiento. Mientras que pipetas, guantes y vasos de precipitados también fueron utilizados en el desarrollo experimental.

Finalmente se realizó la inclusión de las muestras en parafina a 60 °C (temperatura de fusión de la parafina) con la ayuda de una estufa (**Figura 2.5.**). De manera previa a formar los bloques, se realizaron 2 cambios de parafina de dos horas de duración para eliminar el xilol restante de las muestras. Una vez obtenidos los bloques por enfriamiento a temperatura ambiente y con ayuda de moldes, se tallaron manualmente y se procedió a su corte con el micrótopo.



Figura 2.5. Imagen de estación de parafinado. Fuente: modificación propia.

2.3.2. Sección

Para realizar los cortes histológicos, se usó un micrótomato de rotación Leica RM2125RT (**Figura 2.6.**), con cuchillas de acero inoxidable. Los cortes se realizaron en secciones de 6 μm de grosor.

Tras la realización de los cortes con el micrótomato, las secciones se depositaron en un baño termostático de flotación a 45-50 $^{\circ}\text{C}$, para favorecer la extensión del tejido. Las secciones obtenidas fueron montadas sobre portaobjetos tratados previamente con Poly-L-lisina para facilitar la adhesión del corte.



Figura 2.6. Fotografía micrótomato Leica RM2125RT. Fuente: propia

2.3.3. Tinciones histomorfológica e histoquímicas

Una vez obtenidos los cortes, se realizó su desparafinado e hidratación, usando como disolvente de la parafina el xilol, y se procedió a sus tinciones.

Para la tinción histomorfológica de los cortes de intestino anterior se utilizó la técnica de Hematoxilina de Harris/Eosina. La tinción con hematoxilina y eosina (H&E) es uno de los métodos de tinción más ampliamente utilizado en histología y medicina

diagnóstica para demostrar la arquitectura histológica general de los tejidos. Su popularidad está basada en su habilidad para demostrar con claridad una gran cantidad de estructuras tisulares.

Para las tinciones histoquímicas en el hígado de los ejemplares, se llevó a cabo las tinciones de diastasa-PAS y Negro Sudán B, asimismo se utilizó la tinción PAS para visualizar los polisacáridos neutros y las glucoproteínas en el intestino anterior. Por un lado, el ácido periódico de Schiff (PAS) interviene para detectar todos los polisacáridos en los tejidos y, la diastasa, es una enzima de origen vegetal que cataliza la hidrólisis de glucógeno, actuando en conjunto se tiñen todos los polisacáridos de los tejidos a excepción del glucógeno, que queda sin teñir. Por otro lado, la tinción Negro Sudán señala una variedad de lípidos intracelulares incluyendo grasas neutras, fosfolípidos y esteroides.

Una vez, el glucógeno y los componentes de naturaleza lipídica quedan expuestos, se puede llevar a cabo un análisis del almacenamiento energético en el tejido estudiado. Todas las tinciones histológicas anteriormente comentadas se detallan junto a sus protocolos en el **Anexo I**.

Finalmente, una vez concluida las tinciones de las muestras, se montaron los portaobjetos utilizando como medio de montaje el compuesto *Eukitt* y se archivaron para su posterior observación.

2.4. Análisis estadístico

Todos los resultados se expresan como el valor medio de la variable \pm el error estándar de la media (EEM). Tras revisarse y confirmarse la normalidad y homocedasticidad de los datos obtenidos, las diferencias entre tratamientos se evaluaron usando el test paramétrico ANOVA unidireccional (1-way ANOVA) en todos los casos. En aquellos parámetros en donde se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos (nivel de significación de P-valor $< 0,05$), se realizó el test de Tukey para su identificación. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, EE.UU.).

2.5. Limitaciones durante el desarrollo del trabajo

La parte experimental del presente trabajo se desarrolló de manera normal, permitiendo presentar datos de crecimiento e índices somáticos de los ejemplares ensayados. Aun así, debido al decreto del actual “estado de alarma”, y por tanto de la interrupción del estudio histológico desarrollado en el laboratorio, solo se ha podido alcanzar e incluir en este trabajo (y de forma teórica) el fotografiado de las tinciones histológicas de las muestras. La visualización y el fotografiado de dichas técnicas no pudo ser realizado, por consiguiente, tampoco la obtención de resultados reales en este sentido. Por ello, se ha planteado unos “hipotéticos” resultados en base a los datos obtenidos en los estudios biométricos, además de en relación a trabajos previos en esta materia tras una exhaustiva búsqueda bibliográfica.

3. Resultados y Discusión

3.1. Crecimiento y eficiencia alimenticia

Todos los grupos experimentales llevaron a cabo un crecimiento alométrico continuado (**Figura 3.1.A**), y no se observó mortalidad en ninguno de los grupos y unidades experimentales. Así, el peso final promedio registrado fue de 81, 62, 71 y 61 gramos para los grupos C+, C-, IB y LP, respectivamente (**Figura 3.1.B**). La tasa de crecimiento específica (SGR) también confirma una diferencia significativa entre grupos, presentando el grupo C+ el valor más elevado (1,2 %/día), seguido por el grupo suplementado con IB (~1%), y finalmente los grupos C- y LP con los valores más bajos (0,8-0,9%) (**Figura 3.1.C**). Los resultados obtenidos muestran unos valores de crecimiento significativamente menores para los grupos basados en ingredientes vegetales (75 % de sustitución de harina de pescado, y ~50% de aceite de pescado) respecto al grupo testado con ingredientes de procedencia animal (grupo control). Dichos resultados coinciden con Kokou (2012), en donde se muestra que la sustitución superior al 60% de ingredientes animales con harina de soja provoca una disminución significativa (p -valor < 0,001) del crecimiento, el cual se acentúa con el incremento de inclusión de esta harina vegetal. Aun así, es muy importante remarcar que el grupo suplementado con el compuesto ImmunoBoost (IB) revierte parcialmente los efectos negativos de los compuestos vegetales, al menos en cuanto a rendimiento productivo se refiere, por lo que el uso de este compuesto podría arrojar mayores efectos beneficiosos en dietas formuladas con compuestos vegetales, pero no tan extremas como las usadas en el presente experimento (Sánchez-Ruiz, 2020), o incluso en dietas completamente vegetales formuladas para especies omnívoras/herbívoras.

En lo referente a la eficiencia de alimentación, todos los grupos consumieron la misma cantidad de alimento, por lo que se puede afirmar que la formulación base de los piensos utilizados (animal vs vegetal), así como los compuestos nutracéuticos, no parecen ejercer ningún efecto, ni positivo ni negativo, en relación al apetito e ingesta de alimento. Aun así, los resultados también indicaron diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales, siendo el valor más elevado (*i.e.* cada kg de pienso produce una mayor conversión en peso del animal) presentado por el grupo C+ (0,79), continuado del grupo IB (0,68) y por último los grupos C- y LB (0,55-0,56) (**Figura 3.1.D**). Al alimentarse con la misma cantidad de pienso y presentar diferentes valores de crecimiento, los diferentes grupos experimentales denotan distintas actividades de

asimilación y digestión de los nutrientes, por lo que para aclarar dichas diferencias se requiere un estudio histomorfológico e histoquímico que, acompañado de los diferentes índices somáticos calculados, pueda arrojar indicios de los efectos fisiológicos causados en relación a la asimilación de nutrientes y orquestación de reservas energéticas.

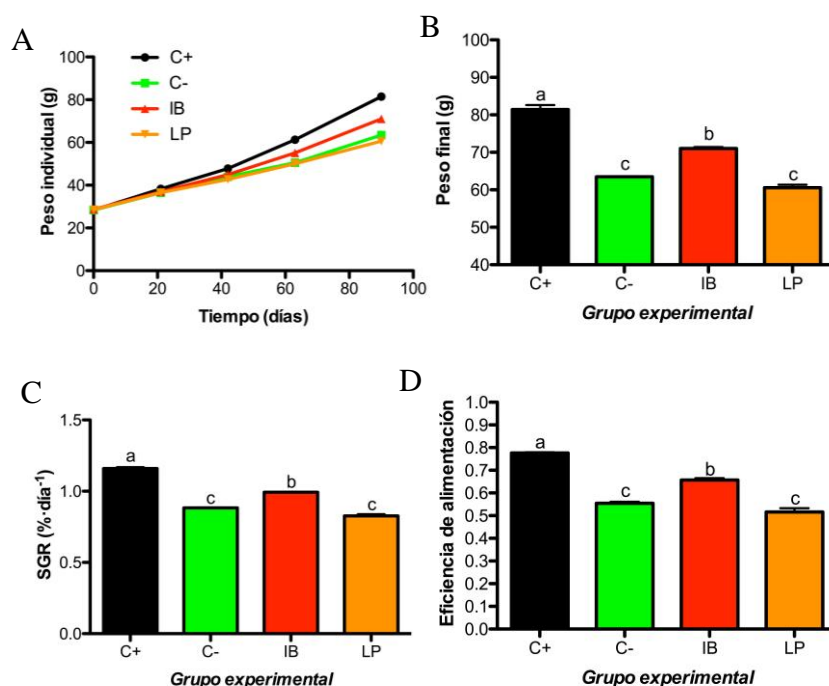


Figura 3.1. Evolución del crecimiento (A), peso final (B), tasa de crecimiento específica (C) y eficiencia de alimentación (D) en juveniles de dorada (*S. aurata*) alimentados durante 90 días con cuatro dietas experimentales. Los resultados se expresan como el promedio \pm EEM de los tanques triplicados para cada grupo experimental. Diferentes letras en cada grupo indican diferencias significativas entre tratamientos (one-way ANOVA, seguido del Test de Tukey; $p < 0,05$). C+: control positivo; C-: control negativo; IB: LB-ImmunoBoost (1%); LP: LB-LiverProtect (1%).

3.2. Índices somáticos y comparativa histológica

3.2.1. Intestino

En los diferentes grupos experimentales, el índice de la longitud intestinal (ILI) mostró unos valores superiores al 100%. Además, el grupo alimentado con el pienso basado en ingredientes animales (C+) se diferenció de manera notablemente significativa con respecto a los grupos cuyos ingredientes animales fueron sustituidos por ingredientes vegetales (C-, IB y LP), produciendo éstos últimos piensos una mayor elongación del intestino, aunque para el caso del grupo suplementado con LB-LiverProtect esta tendencia no llegó a ser significativamente diferente con respecto a ninguno de los otros grupos experimentales (**Figura 3.2.**).

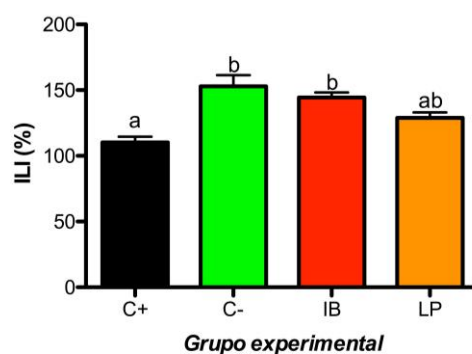


Figura 3.2. Índice de longitud del intestino (ILI) en juveniles de dorada (*S. aurata*) alimentados durante 90 días con cuatro dietas experimentales. Los resultados se expresan como el promedio \pm EEM de 6 peces por grupo experimental. Información complementaria similar a lo descrito en la **Figura 3.1.**

A causa de la mayor complejidad estructural de los compuestos vegetales (presencia de celulosa y fibra, entre otros) junto a sus efectos antinutricionales, la digestibilidad del alimento decrece, con el consecuente crecimiento longitudinal del intestino como respuesta fisiológica. De esta forma, los resultados postulan la existencia de un aumento de la capacidad de absorción debido a una mayor superficie de absorción y el aumento del tiempo de residencia del alimento en el intestino, existiendo una relación directa entre inclusión de compuestos vegetales en pienso y longitud del intestino, tal y como se ha demostrado anteriormente en *S. aurata* (Vizcaíno y col., 2016; Perera y col., 2019). Aun así, es importante remarcar que dicha elongación en el grupo alimentado con la dieta suplementada con el compuesto LP no se produjo en la misma medida que en los otros dos grupos de formulación similar (C- e IB), lo que podría sugerir una respuesta fisiológica diferente al comentado anteriormente, suponiendo de la misma manera un aumento de la capacidad de absorción.

Hipotéticamente, los resultados histológicos de la estructura intestinal del grupo C- respecto al grupo C+ deberían denotar alteraciones severas. El grupo alimentado con un pienso control (C+) no presentaría visualmente ninguna alteración en la estructura del intestino anterior (**Figura 3.3.A**). En cambio, los elementos antinutricionales de los piensos formulados en base a ingredientes vegetales (C-) inducirían perturbaciones graves en la integridad estructural del intestino anterior, provocando una disminución de la capacidad de absorción del intestino. Daños severos, indicadores de una mala regulación de la microbiota bacteriana como vacuolización de la capa mucosa, infiltración de leucocitos e inflamación de la capa mucosa son fácilmente observables en este tipo de casos (**Figura 3.3.B**), habiendo sido dichos efectos previamente descritos por diversos autores como Caballero y col. (2003), Kokou y col. (2012) en *S. aurata* y Krogdahl (2003) en *Salmo salar*. Además, se sabe que la integridad estructural y funcional del intestino

viene dado por el equilibrio de 3 factores: i) la microbiota, ii) una buena salud e integridad de la capa mucosa, y iii) un correcto sistema inmunitario local (McGuckin, 2009; Estensoro et al., 2016), por lo que la homeostasis intestinal se verá afectada por la perturbación de estos componentes.

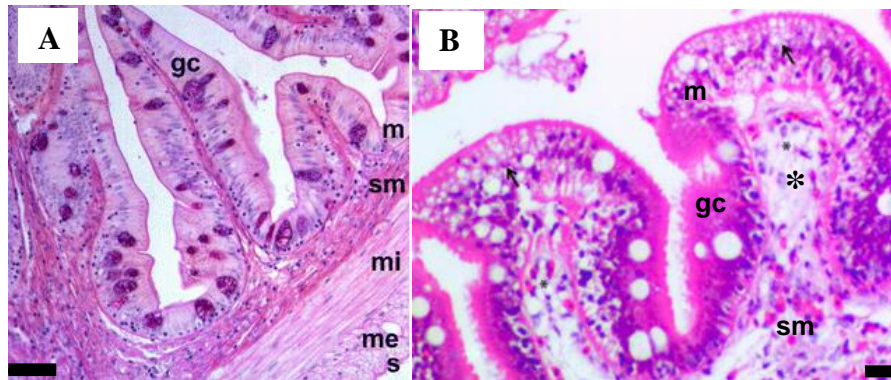


Figura 3.3. **A.** Cortes histológicos de intestino anterior de dorada que hipotéticamente podrían corresponderse con los de ejemplares alimentados con piensos animales (C+) (tinción PAS, Barra: 50 μ m). **B.** Estado hipotético del intestino anterior con alteraciones en doradas alimentados con el grupo C- (H&E, Barra: 20 μ m). En la fotografía (B) se observa un **incremento de vacuolas entre enterocitos (flechas)** y **la submucosa inflamada (*)**. **mucosa (m); submucosa (sm); muscularis interna (mi); muscularis externa (me); serosa (s); células calciformes (gc)**. Fuente: Kokou y col., 2012; Cerezuela y col. (2012) con modificación propia.

De esta forma, se podría hipotetizar que el análisis histológico del intestino anterior en el grupo LP mostraría un aumento en la superficie del microvilli debido al incremento de la longitud de los pliegues en la mucosa (**Figura 3.4.B**) en comparación con el grupo C+ (**Figura 3.4.A**). Así, i) la existencia de un aumento de la superficie de contacto con el lumen que mejoraría la capacidad de absorción del intestino, junto con ii) el aumento no tan acusado (respecto a los grupos C- e IB) de la longitud intestinal, podría considerarse como una respuesta fisiológica a nivel intestinal para tratar de compensar los factores antinutricionales de los compuestos vegetales tras la suplementación con este compuesto nutracéutico.

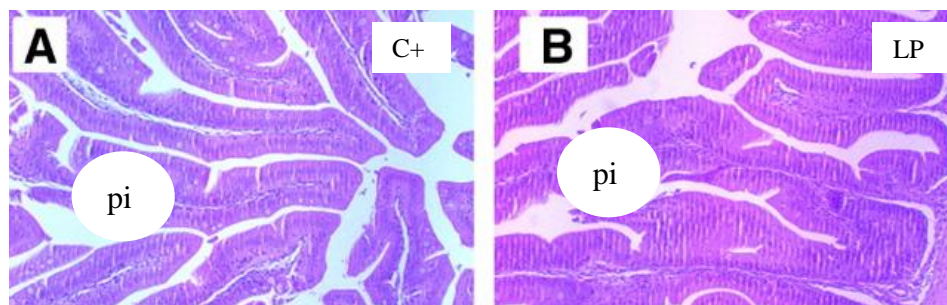


Figura 3.4. **A.** Cortes histológicos de intestino anterior de dorada que hipotéticamente podrían corresponderse con los de ejemplares del grupo C+. **B.** Supuesto estado del intestino anterior en doradas alimentadas con el grupo LP. **pi (pliegue intestinal)**. Tinciones de H&E y zoom $\times 40$. Fuente: Vizcaíno y col. (2014), con modificación propia.

Por otro lado, el análisis histológico también podría revelar que los daños estructurales en el epitelio intestinal son causados por los ingredientes vegetales (**Figura 3.3.B**) no serían los únicos, encontrándose otras alteraciones indicadoras de un daño estructural en la mucosa, y por tanto una reducción de la capacidad de absorción (**Figura 3.5.**).



Figura 3.5. Capa mucosa en intestino anterior de dorada con degeneración (aumento del espacio intercelular), de forma hipotética, en el grupo experimental LP. **Lam (lamina propia)** y **flecha bidireccional (área degenerada)**. Tinción H&E y zoom $\times 40$. Fuente: Atalah y col. (2007).

A diferencia de lo descrito para el caso del grupo LP, el análisis histológico del grupo IB revelaría una disminución de los daños encontrados en el intestino anterior causados por la dieta vegetal (**Figura 3.3.B**), motivo por el cual se ha observado del mismo modo una mejora en los rendimientos productivos y de asimilación de nutrientes (ver apartado 3.1). De esta manera, podríamos sugerir que los signos de inflamación y vacuolización entre enterocitos se verían significativamente reducidos, y se podría considerar que estos efectos pasarían de ser graves (como en C-) para ser leves (**Figura 3.6.**).



Figura 3.6. Epitelio de la mucosa en intestino anterior de dorada con grados leve de degeneración (baja vacuolización y leve infiltración de enterocitos en la submucosa) que, de forma hipotética, se podrían encontrar en el grupo experimental IB. **SMI (infiltración de la submucosa)**. Tinción H&E y zoom $\times 20$. Fuente: Estruch y col. (2018).

Según Patterson y col. (1993) las alteraciones mencionadas, como el aumento del número de vacuolas en la capa mucosa y la inflamación de la capa submucosa son síntomas de una deficiencia inmunitaria. En las últimas décadas, se ha estudiado el efecto de piensos formulados a partir de ingredientes vegetales, habiéndose demostrado que la inclusión de aceite vegetal en piensos utilizados en acuicultura altera de manera negativa la respuesta inmunitaria en peces (Dalmo y col., 1997; Montero y col., 2003). Los mecanismos relacionados con dicha respuesta han sido descritos a nivel genético, poniendo de manifiesto que las dietas con aceites vegetales reducen la transcripción de genes vinculados a la respuesta inmune (Machado y col., 2019). En este sentido, la homeostasis intestinal sufre un trastorno inmune, repercutiendo así en el equilibrio de los 3 componentes que afectan a la funcionalidad intestinal. De esta forma, el desequilibrio desemboca en daños tanto funcionales como estructurales en el intestino, y, por consiguiente, una reducción de su capacidad de absorción.

A partir de nuestros resultados, así como gracias a la bibliografía encontrada sobre esta materia, sería plausible que el uso de un pienso suplementado con compuestos nutraceuticos estimulantes del sistema inmune, como es el caso del grupo IB, mejora los daños causado por los factores antinutricionales de ingredientes vegetales en el intestino anterior. Esta conclusión está apoyada por estudios recientes, en donde se evidencia una mejora de la funcionalidad intestinal conseguida con el uso de un probiótico estimulante de del sistema inmune en *S. aurata* (Pérez-Sánchez y col., 2015).

3.2.2. Hígado y grasa perivisceral

Referente al índice hepatosomático (IHS) y al índice mesentérico (MSI), los resultados obtenidos en este estudio indican la ausencia de diferencias estadísticamente significativas ($p\text{-valor} > 0.05$) en ambos parámetros (**Figura 3.7.**).

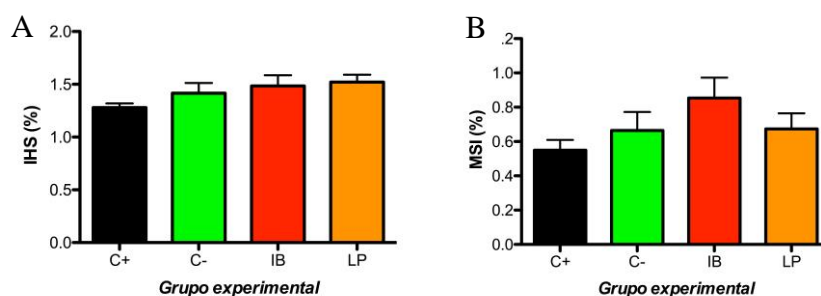


Figura 3.7. Índice hepatosomático (IHS, A) e índice mesentérico (MSI, B) en juveniles de dorada (*S. aurata*) alimentados durante 90 días con cuatro dietas experimentales. Los resultados se expresan como el promedio \pm EEM de 6 peces de los tanques triplicados para cada grupo experimental. No se presentan diferencias significativas entre tratamientos (one-way ANOVA). Información complementaria en **Figura 3.1.**

El hígado es el tejido más susceptible y alterable ante un cambio de alimentación (Paredes y col., 2015) debido a que puede considerarse como uno de los órganos más importantes, junto con el tejido adiposo (grasa mesentérica o perivisceral), de reservas energéticas. Sin embargo, nuestros resultados no muestran ninguna diferencia significativa del índice hepatosomático (IHS) entre los grupos experimentales, aunque sí una tendencia de aumento en los tres grupos alimentados con dietas vegetales (C-, IB y LP), lo que puede sugerir la existencia de un balance u homeostasis orquestada entre los procesos de rendimiento productivo y bienestar animal (mayor crecimiento somático implicaría un mayor gasto energético, y por tanto una menor acumulación de reservas). En este sentido, a nivel histológico, podríamos considerar que se visualizaría un ligero aumento de lípidos y glucógeno hepáticos, en animales alimentados con dietas basadas en piensos vegetales (**Figuras 3.8.B-D**) en comparación con los animales alimentados con piensos de origen animal (**Figuras 3.8.A-C**), que no supondría ningún tipo de daño estructural ni funcional.

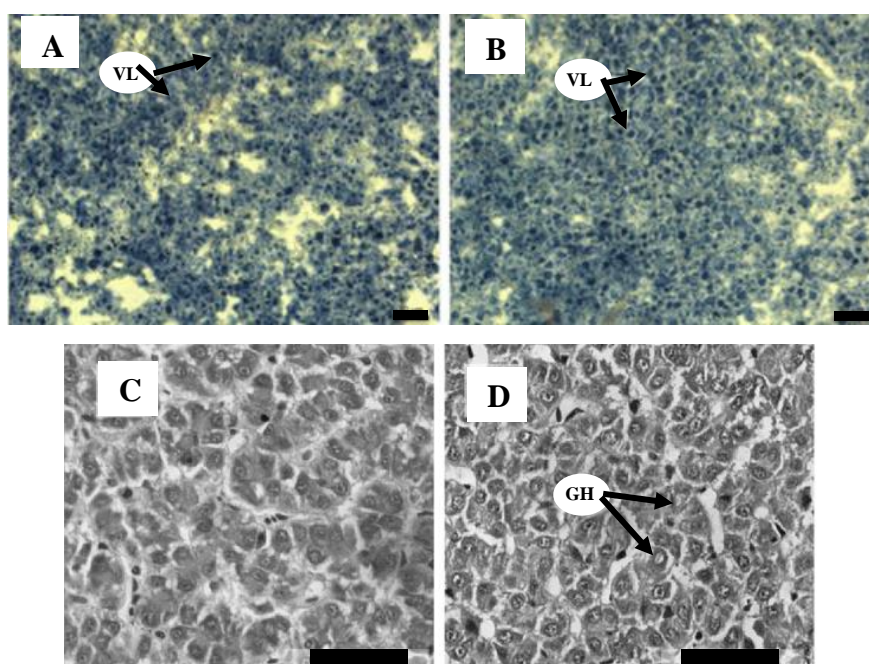


Figura 3.8. A y B. Microfotografías de hígado de lubina (*Dicentrarchus labrax*) (Tinciones Negro Sudan, Barras: 50 µm). C y D. Microfotografías de trucha arcoíris (*Onchorynchus mykiss*) (Tinciones diatasas-PAS, Barras: 50 µm). Dichas imágenes podrían ser representativas del grupo C+ (A y C) y del grupo C- (B y D). VL (vacuolas con lípidos) y GH (glucógeno hepático) Fuente: Cástro y col, 2016 y Sicuro y col., 2010.

En investigaciones anteriores, se ha observado estos mismos resultados en el tejido hepático de peces alimentados con dietas vegetales en peces (Kokou y col., 2012; Martos-Sitcha y col., 2018).

En referente al MSI, es este estudio no existe ninguna evidencia significativa con la que se pueda concluir una diferencia de MSI entre los grupos experimentales, aunque en la **figura 3.7.B** se puede observar que el grupo IB presenta un ligero incremento en este índice. Con los resultados actuales, no podemos concluir si esta tendencia pudiera ser relativa al balance energético entre un mayor aporte de ácidos grasos, procedentes del cóctel de microalgas utilizadas en este compuesto, y del menor crecimiento observado de este grupo experimental con respecto al grupo control (C+), o incluso de la preferencia en el almacenamiento y uso de algunos de ellos (ácidos grasos poliinsaturados, monoinsaturados, saturados, etc). Aun así, estudios recientes sugieren que el índice mesentérico aumenta a causa de un aumento de la grasa perivisceral por una mejora de la tasa metabólica (Martos-Sitcha y col., 2018), y por tanto sería necesario la realización de diversos análisis metabólicos para esclarecer si esta tendencia observada es causa o consecuencia del perfil de ácidos grasos aportado por los compuestos utilizados o por un reajuste metabólico.

En este sentido metabólico, y desde un punto de vista hormonal, se ha demostrado una reducción del cortisol en plasma de *S. aurata* a causa de la sustitución de ingredientes animales por otros vegetales (Montero y col., 2008), o lo cual podría ser debido a la disminución de los valores circulantes de colesterol plasmático (precursor de las hormonas esteroideas, como el cortisol) en ejemplares alimentados con piensos vegetales (Kaushik y col., 1995, 2004; Sitjà-Bobadilla y col., 2005). En los últimos años se ha demostrado que esta disminución es causada a nivel genético, al reducirse el proceso de transcripción de genes relacionados directamente con la síntesis de cortisol (Machado y col., 2019). El cortisol cumple un rol regulador importante en el metabolismo de diferentes órganos, como el hígado o el tejido adiposo, inhibiendo la síntesis de glucógeno (Kuo et al., 2013) e induciendo la movilización de glucosa y ácidos grasos de las reservas para producir energía y superar el estímulo estresante (Mommensen et al 1999). Por consiguiente, una reducción de la transcripción de los genes nombrados supondría el efecto inverso, mayor síntesis de glucógeno y lípidos en órganos cuya función sea el almacenamiento de energía, en cuyo caso, al aumento de la masa hepática y perivisceral. Así, la relación del cortisol con los reservorios energéticos del hígado y de la grasa perivisceral ha sido anteriormente demostrado (Martos-Sitcha y col., 2018; Machado y col., 2019), apoyando la hipótesis planteada a raíz de los datos obtenidos, así como de la búsqueda bibliográfica disponible en esta materia.

3.3. Observaciones finales y perspectivas futuras

A modo de resumen, el crecimiento está directamente relacionado con la capacidad de absorción del intestino, garantizar la integridad y funcionalidad intestinal de los animales repercutirá en la correcta asimilación de los nutrientes. Estudios previos han demostrado una disminución del crecimiento debido a la sustitución de ingredientes animales por otros de origen vegetal, provocando daños estructurales a nivel tisular y deterioro de la salud intestinal. En este contexto y en el caso de afecciones en el hígado, todavía no han sido evidenciados daños tisulares que afecten al crecimiento. El efecto de los diferentes grupos experimentales vendrá dado por las diferentes composiciones microalgales presentes en los compuestos nutraceuticos estudiados, cada uno con sus respectivos productos naturales y efectos en el organismo. En el presente estudio se sugiere el efecto, a nivel histológico del intestino anterior e hígado, inducido por la suplementación a concentraciones bajas (1%) de los compuestos LB-LiverProtect y LB-ImmunoBoost en la dieta de piensos vegetales, y por consiguiente en el rendimiento productivo. Así, se postula que LB-LiverProtect podría mostrar un aumento de la densidad del microvilli y un aumento de la longitud del pliegue intestinal, lo cual podría hacer que mejorase la capacidad de absorción con respecto al grupo C-, aunque sin mostrar signos de mejora en el crecimiento debido a que el daño tisular relacionado con los componentes antinutricionales de ingredientes vegetales no disminuyeron. Por otro lado, en el presente trabajo se manifiesta una mejora en dichos daños con la suplementación del producto LB-ImmunoBoost, en donde a pesar de no alcanzar los valores de crecimiento de C+, podría suponer una mejora a nivel de absorción intestinal y orquestación metabólica respecto a los piensos sustituidos con ingredientes vegetales (C-).

4. Conclusiones

1. De manera hipotética, el análisis histológico e histoquímico ha demostrado diferencias en el intestino anterior en los diferentes grupos experimentales, mientras que en el hígado no se han encontrado variaciones notables.
2. El nutraceutico LB-LiverProtect sugiere una mejora en la capacidad de absorción del intestino, aumentando la superficie en contacto con el lumen intestinal. A pesar de ello, los daños del intestino causados por los ingredientes vegetales no parecen reducirse y presuntamente aparecerán nuevas alteraciones.
3. El nutraceutico LB-ImmunoBoost sugiere una disminución de los daños de la estructura intestinal ocasionados por ingredientes vegetales, con la subsecuente de una mejora de la salud intestinal debida a una activación del sistema inmunológico local.
4. Las dietas basadas en ingredientes vegetales reducen de manera considerable el crecimiento de doradas, aunque la suplementación de dicha dieta con el compuesto LB-ImmunoBoost mejora el rendimiento productivo de los animales; en contraposición, la suplementación con el compuesto LiverProtect no supone cambio alguno.

5. Referencias

- Andreotti, V. (2019). Microalgae in aquaculture wastewater: a new forecasting method of production in a marine system (Doctoral thesis). Universitat Politècnica de Catalunya.
- Arias, A. M., & de la Torre, M. (2019). *Sparus aurata*: base de datos terminológica y de identificación de especies pesqueras de las costas de Andalucía.
- Extraído de: http://www.ictieterm.es/nombre_cientifico.php?nc=109
- Atalah, E., Cruz, C. H., Izquierdo, M. S., Rosenlund, G., Caballero, M. J., Valencia, A., & Robaina, L. (2007). Two microalgae *Cryptocodinium cohnii* and *Phaeodactylum tricornutum* as alternative source of essential fatty acids in starter feeds for seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 270(1-4), 178-185.
- Barker, N. (2013). Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(1), 19-33.
- Bauchot, M. L., & Hureau, J. C. (1986). Sparidae. In: *Fishes of the northeastern Atlantic and the Mediterranean*, vol. 2 (eds. Whitehead PJP Bauchot ML Hureau JC Nielsen J. Tortonese). p. 883-907. United Nations Educational Scientific and Cultural Organization (UNESCO), Paris.
- Bruno, D. W., Poppe, T. T., & David W. Bruno. (1996). *A Colour Atlas of Salmonid Diseases*. Amsterdam, Países Bajos: Amsterdam University Press.
- Caballero, M. J., Izquierdo, M. S., Kjørsvik, E., Montero, D., Socorro, J., Fernández, A. J., & Rosenlund, G. (2003). Morphological aspects of intestinal cells from gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed diets containing different lipid sources. *Aquaculture*, 225(1-4), 325-340.
- Cabral, E.M., Bacelar, M., Batista, S., Castro-Cunha, M., Ozório, R.O.A., & Valente, L.M.P. (2011). Replacement of fishmeal by increasing levels of plant protein blends in diets for Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles. *Aquaculture*, 322–323, 74–81.
- Junqueira, L., & Carneiro, J. (2006). *Histología básica* (Spanish Edition) (6.^a ed.). Barcelona, España: Elsevier España, S.L.U.
- Castro, C., Couto, A., Pérez-Jiménez, A., Serra, C. R., Díaz-Rosales, P., Fernandes, R., ... & Oliva-Teles, A. (2016). Effects of fish oil replacement by vegetable oil blend on digestive enzymes and tissue histomorphology of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Fish physiology and biochemistry*, 42(1), 203-217.
- CECOPESCA (2012). El aprovechamiento de los subproductos de pescado para la obtención de productos funcionales y bioactivos. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente
- Extraído de: https://www.mapa.gob.es/es/pesca/temas/calidad-seguridad-alimentaria/06_Guia_Subproductos_tcm7-248616_tcm30-285791.pdf
- Cerezuela, R., Fumanal, M., Tapia-Paniagua, S. T., Meseguer, J., Moriñigo, M. Á., & Esteban, M. Á. (2012). Histological alterations and microbial ecology of the intestine in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) fed dietary probiotics and microalgae. *Cell and tissue research*, 350(3), 477-489.
- Dalmo, R.A., Ingebrigtsen, K., & Bogwald, J. (1997). Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system. *Journal of Fish Diseases*, 20, 241–273.
- Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO (2005). Programa de información de especies acuáticas. *Sparus aurata*.
- Extraído de: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Sparus_aurata/es
- Estensoro, I., Ballester-Lozano, G., Benedito-Palos, L., Grammes, F., Martos-Sitcha, J. A., Mydland, L. T., ... & Øverland, M. (2016). Dietary butyrate helps to restore the intestinal status of a marine teleost (*Sparus aurata*) fed extreme diets low in fish meal and fish oil. *PLoS One*, 11(11).
- Estruch, G., Collado, M. C., Monge-Ortiz, R., Tomás-Vidal, A., Jover-Cerdá, M., Peñaranda, D. S., ... & Martínez-Llorens, S. (2018). Long-term feeding with high plant protein based diets in gilthead seabream (*Sparus aurata*, L.) leads to changes in the inflammatory and immune related gene expression at intestinal level. *BMC veterinary research*, 14(1), 302.
- FAO (2018). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Roma. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Extraído de <http://www.fao.org/3/I9540ES/i9540es.pdf>
- FAO (2020). Aquaculture feed and fertilizer resources information system. Gilthead seabream-Natural food and feeding habits.
- Extraído de: <http://www.fao.org/fishery/affris/species-profiles/gilthead-seabream/natural-food-and-feeding-habits/en/>

- Fawcett, D. W. (1995). Bloom-Fawcett: tratado de histología. In Fawcett DW: Tratado de Histología, 660-685. Interamericana-McGraw-Hill, México: Labor.
- Ferreira-Montero, I. J., & Luengo-Fernández, E. (2007). Nuevos alimentos, alimentos funcionales y nutraceuticos. In Nutrición, salud y alimentos funcionales. Sociedad española de cardiología. Extraído de: <https://secardiologia.es/images/publicaciones/libros/2007-sec-monografia-nutraceuticos.pdf>
- Geneser, F. (1986). Textbook of histology. Copenhagen, Denmark: Munksgaard.
- Güroy, B.K., Cirik, S., Güroy, D., Sanver, F., & Tekinay, A.A., (2007). Effects of *Ulva rigida* or *Cystoseira barbata* meals as a feed additive on growth performance, feed utilization, and body composition in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 31(2), 91–97.
- Hany M. R. Abdel-Latif., Riad H. Khalil., Hanaa R. El-hofi., Talaat T. Saad., & Shaimaa M. A. Zaid. (2015). Epidemiological investigations of Mycotic infections of cultured Gilthead seabream, *Sparus aurata* at Marriott Lake, Egypt. International Journal of Fisheries and Aquatic Studies, 2015; 2(3): 05-13.
- Harel, M., Koven, W., Lein, I., Bar, Y., Behrens, P., Stubblefield, J., Zoha, Y., & Place, A.R. (2002). Advanced DHA, EPA and ArA enrichment materials for marine aquaculture using single cell heterotrophs. Aquaculture, 213, 347–362.
- Hibiya, T. (1982). Atlas of fish histology. Tokyo, Japan: Kodansha.
- Kaushik, S. J., Coves, D., Dutto, G., & Blanc, D. (2004). Almost total replacement of fish meal by plant protein sources in the diet of a marine teleost, the European seabass, *Dicentrarchus labrax*. Aquaculture, 230, 391–404.
- Kaushik, S. J., Cravedi, J. P., Lalles, J. P., Sumpter, J., Fauconneau, B., & Laroche, M. (1995). Partial or total replacement of fish meal by soybean protein on growth, protein utilization, potential estrogenic or antigenic effects, cholesterolemia and flesh quality in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture, 133, 257–274.
- Kokou, F., Rigos, G., Henry, M., Kentouri, M., & Alexis, M. (2012). Growth performance, feed utilization and non-specific immune response of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed graded levels of a bioprocessed soybean meal. Aquaculture, 364, 74-81.
- Krogdahl, Å., Bakke-McKellep, A. M., & Baeverfjord, G. (2003). Effects of graded levels of standard soybean meal on intestinal structure, mucosal enzyme activities, and pancreatic response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture Nutrition, 9(6), 361-371.
- Kuo, T., Harris, C. A., & Wang, J. C. (2013). Metabolic functions of glucocorticoid receptor in skeletal muscle. Molecular and Cellular Endocrinology, 380(1-2), 79-88.
- Lin, S., & Luo, L., (2011). Effects of different levels of soybean meal inclusion in replacement for fishmeal on growth, digestive enzymes and transaminase activities in practical diets for juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. Anim. Feed Sci. Technol, 168, 80–87.
- Lupatsch, I. (2009). Quantifying nutritional requirements in aquaculture — the factorial approach. In: (eds. Burnell, G., Allan, G.), New Technologies in Aquaculture: Improving Production Efficiency, Quality and Environmental Management, Woodhead Publishing, pp. 417–439 (Cambridge).
- Machado, M., Castro, C., Oliva-Teles, A., & Costas, B. (2019). Interactive effects of dietary vegetable oil and carbohydrate incorporation on the innate immune response of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles subjected to acute stress. Aquaculture, 498, 171-180.
- Martos-Sitcha, J. A., Simó-Mirabet, P., Piazzon, M. C., de las Heras, V., Caldach-Giner, J. A., Puyalto, M., ... & Pérez-Sánchez, J. (2018). Dietary sodium heptanoate helps to improve feed efficiency, growth hormone status and swimming performance in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Aquaculture nutrition, 24(6), 1638-1651.
- McGuckin, M. A., Eri, R., Simms, L. A., Florin, T. H., & Radford-Smith, G. (2009). Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases. Inflammatory bowel diseases, 15(1), 100-113.
- Mommsen, T. P., Vijayan, M. M., & Moon, T. W. (1999). Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 9(3), 211-268.
- Montero, D., Grasso, V., Izquierdo, M. S., Ganga, R., Real, F., Tort, L., ... & Acosta, F. (2008). Total substitution of fish oil by vegetable oils in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) diets: effects on hepatic Mx expression and some immune parameters. Fish & Shellfish Immunology, 24(2), 147-155.
- Montero, D., Kalinowski, T., Obach, A., Robaina, L., Tort, L., Caballero, M. J., & Izquierdo, M. S. (2003). Vegetable lipid sources for gilthead seabream (*Sparus aurata*): effects on fish health. Aquaculture, 225(1-4), 353-370.

- Nagel, F., Slawski, H., Adem, H., Tressel, R.-P., Wysujack, K., & Schulz, C. (2012). Albumin and globulin rapeseed protein fractions as fishmeal alternative in diets fed to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W.). *Aquaculture*, 354–355, 121–127.
- NOAA Fisheries (2018), Feeds for aquaculture, Aquaculture.
Extraído de: <https://www.fisheries.noaa.gov/aquaculture/aquaculture-feeds-and-nutrition>.
- Paredes, J. F., López-Olmeda, J. F., Martínez, F. J., & Sánchez-Vázquez, F. J. (2015). Daily rhythms of lipid metabolic gene expression in zebra fish liver: response to light/dark and feeding cycles. *Chronobiology international*, 32(10), 1438-1448.
- Patterson BK., Ehrenpreis ED., & Yokoo H. (1993) Focal enterocyte vacuolization. A new microscopic finding in the acquired immune deficiency wasting syndrome. *Am J Clin Pathol*, 99:24–27
- Pavlidis, M. A., & Mylonas, C. C. (2011). In *Sparidae: Biology and Aquaculture of Gilthead Sea Bream and other Species*. Hoboken, NJ, Estados Unidos: John Wiley & Sons.
- Perera, E., Simó-Mirabet, P., Shin, H. S., Rosell-Moll, E., Naya-Catalá, F., de las Heras, V., ... & Chaves, E. (2019). Selection for growth is associated in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) with diet flexibility, changes in growth patterns and higher intestine plasticity. *Aquaculture*, 507, 349-360.
- Pérez-Sánchez, J., Benedito-Palos, L., Estensoro, I., Petropoulos, Y., Calduch-Giner, J. A., Browdy, C. L., & Sitjà-Bobadilla, A. (2015). Effects of dietary NEXT ENHANCE® 150 on growth performance and expression of immune and intestinal integrity related genes in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Fish & shellfish immunology*, 44(1), 117-128.
- Polakof, S., Panserat, S., Soengas, J. L., & Moon, T. W. (2012). Glucose metabolism in fish: A review. In *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 182(8), 1015-1045.
- Saiz, M. (2019), Crecimiento de la lubina alimentada con piensos ecológicos conteniendo diferentes niveles de harina de pescado (Trabajo final de Máster). Universidad Politécnica de València.
- Salinas, D. (2011). El sistema digestivo de peces Teleósteos (Doctoral tesis). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Sánchez-Ruiz, D. (2020). Uso de nuevos aditivos funcionales en acuicultura (Trabajo final de Máster). Universidad de Cádiz.
- Santigosa, E., Sánchez, J., Médale, F., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J., & Gallardo, M. A. (2008). Modifications of digestive enzymes in trout (*Oncorhynchus mykiss*) and sea bream (*Sparus aurata*) in response to dietary fish meal replacement by plant protein sources. *Aquaculture*, 282(1-4), 68-74.
- Science Learning Hub-Pokapū Akoranga Pūtaiao (2011). Digestive enzymes.
Extraído de: <https://www.sciencelearn.org.nz/resources/1840-digestive-enzymes>.
- Sheridan, M. A. (1988). Lipid dynamics in fish: aspects of absorption, transportation, deposition and mobilization. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 90(4), 679-690.
- Sicuro, B., Badino, P., Dapra, F., Gai, F., Galloni, M., Odore, R., ... & Macchi, E. (2010). Physiological effects of natural olive oil antioxidants utilization in rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) feeding. *Aquaculture international*, 18(3), 415-431.
- Sitjà-Bobadilla, A., Peña-Llopis, S., Gómez-Requeni, P., Médale, F., Kaushik, S., & Pérez-Sánchez, J. (2005). Effect of fish meal replacement by plant protein sources on non-specific defence mechanisms and oxidative stress in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 249, 387–400.
- Sørensen, M., Berge, G. M., Reitan, K. I., & Ruyter, B. (2016). Microalga *Phaeodactylum tricornutum* in feed for Atlantic salmon (*Salmo salar*)—Effect on nutrient digestibility, growth and utilization of feed. *Aquaculture*, 460, 116-123.
- Suematsu, M., & Aiso, S. (2001). Professor Toshio Ito: a clairvoyant in pericyte biology. *The Keio journal of medicine*, 50(2), 66-71.
- Vizcaíno, A. J., López, G., Sáez, M. I., Jiménez, J. A., Barros, A., Hidalgo, L., ... & Alarcón, F. J. (2014). Effects of the microalga *Scenedesmus almeriensis* as fishmeal alternative in diets for gilthead sea bream, *Sparus aurata*, juveniles. *Aquaculture*, 431, 34-43.
- Vizcaíno, A. J., Saéz, M. I., López, G., Arizcun, M., Abellán, E., Martínez, T. F., ... & Alarcón, F. J. (2016). *Tetraselmis suecia* and *Tisochrysis lutea* meal as dietary ingredients for gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fry. *Journal of applied phycology*, 28(5), 2843-2855.

6. Anexos

Anexo I

-Tinción H&E

La hematoxilina es un colorante básico que se encarga de teñir estructuras ácidas o basófilas, aunque este no es un colorante en sí, puesto que para obtener una adecuada tinción nuclear necesitamos la presencia de un mordiente. Los mordientes más comunes son sales de metales como el aluminio, hierro y tungsteno, y dependiendo del tipo de mordiente que utilicemos, obtendremos un color final del tejido teñido u otro. En este caso, la Hematoxilina de Harris (Harris, 1990) utiliza como mordiente sales de aluminio, dando una coloración azul-negro a los núcleos de las células.

Por otro lado, la eosina es un colorante ácido que tiñe estructuras básicas o eosinófilas, obteniendo una coloración con diferentes tonos de rojo y rosa, consiguiendo una distinción entre el citoplasma de diferentes tipos celulares, así como los diferentes tipos de fibras y matrices de tejido conectivo.

Protocolo

- 1. Desparafinar e hidratar.**
- 2. Teñir con hematoxilina, previamente filtrada, durante 6 minutos.**
- 3. Lavar con agua corriente durante 10 minutos.**
- 4. Teñir con solución de eosina alcohólica, previamente filtrada, por 1 minuto.**
- 5. Lavar con agua destilada.**
- 6. Deshidratar en alcoholes crecientes (70°, 96° y absoluto) durante 2 minutos.**
- 7. Montar con el cubreobjetos**

Resultados: Citoplasma en colores rosados y núcleos color violeta.

-Tinción diastasa-PAS

Este método de tinción se emplea para detectar polisacáridos en los tejidos, tanto glucógeno como mucopolisacáridos de tal manera que, por un lado, la enzima diastasa cataboliza la hidrólisis del glucógeno, y por otro lado los glúcidos se tiñen de color rosa intenso a fucsia y los núcleos de color azul oscuro (en realidad se tiñe sólo la cromatina) por la acción del ácido periódico de Schiff (PAS). Al realizar dicha tinción se puede

diferenciar el glucógeno, ya que no queda teñido. Cualquier fijador es apropiado para esta técnica.

Protocolo tinción PAS (Peryodic Acid Schiff)

- 1. Añadir ácido peryódico durante 5 min.**
- 2. Lavar con agua corriente durante 2 min.**
- 3. Introducir en REACTIVO DE SCHIFF por 20 min en oscuridad.**
- 4. Lavar en agua destilada durante 2 min.**
- 5. Deshidratar en alcoholes crecientes (70°, 96° y absoluto) durante 2 minutos.**
- 6. Montar con el cubreobjetos**

Resultados: Mucopolisacáridos neutros y glucoproteínas se tiñen de color rosa intenso.

Protocolo tinción Diastasa-PAS

- 1. Desparafinar e hidratar hasta llegar al agua destilada.**
- 2. Colocar los cortes en solución diastasa en estufa durante 6 horas a 37° C.**
- 3. Lavar en agua corriente durante 5 minutos.**
- 4. Colocar en el reactivo de Schiff durante 20-30 minutos.**
- 5. Deshidratar en alcoholes crecientes (70°, 96° y absoluto) durante 2 minutos.**
- 6. Montar con el cubreobjetos**

Resultados: Mucopolisacáridos neutros y glucoproteínas se tiñen de color rosa intenso, el glucógeno queda incoloro.

-Tinción Negro Sudan

Antes de entrar en el proceso de tinción, cabe reseñar que durante el tratamiento de las muestras no se puede hacer uso de alcoholes, ya que estos disuelven los lípidos que se desean teñir, en contraposición de utiliza el fijador de Baker. También cabe destacar que los lípidos químicamente diferentes no pueden distinguirse por este método.

El fijado de Baker se utiliza para conservar elementos de naturaleza lipídica, especialmente fosfolípidos. Se obtiene al añadir 100 ml de agua del grifo a 900 ml de formol tamponado al 10 %.

La técnica del negro de Sudán (Chiffelle & Putt modificada, 1951) realiza principalmente procesos físicos (adsorción) en contraste con la mayoría de los procedimientos de tinción con mecanismos químicos. El tinte se disuelve en un solvente lipídico, y las secciones se tratan con la solución de tinte-solvente. El tinte es más soluble en el lípido perteneciente a la sección del tejido que en el solvente original por lo que, el tinte saldrá del solvente y coloreará el lípido del tejido de color azul-negro. El propilenglicol es el disolvente del tinte, por lo que el disolvente del tinte no disolverá ninguno de los lípidos del tejido.

Protocolo:

- 1. Agregar el fijador de Baker en el portaobjetos durante 5 minutos.**
- 2. Aclarar 3 veces con agua destilada.**
- 3. Agregar 100 % propilenglicol para deshidratar durante 5 minutos.**
- 4. Decantar el propilenglicol y añadir la tinción Negro Sudán durante un mínimo de 2 horas (preferentemente durante la noche)**
- 5. Lavar con tres cambios de agua corriente o agua destilada.**
- 6. Secar el líquido sobrante del portaobjetos.**
- 7. Diferenciar en 85 % de propilenglicol durante 3 minutos.**
- 8. Enjuagar varias veces con agua destilada y luego montar suavemente el cubreobjetos sobre el portaobjetos etiquetado previamente.**
- 9. En el caso de presencia de burbujas, retirar el cubreobjetos con agua caliente, secar el exceso de agua y volver a colocar el cubreobjetos.**

Resultados: Lípidos y fosfolípidos de color negro-azul.
